体外診断用医薬品　　2012 年 10 月改訂（新様式第 1 版）
製品番号 IM1451　　承認番号 20200EZY00111000

クラスⅡ免疫検査用シリーズ
B 細胞キット

IO テスト PE 標識抗体
CD20 IOB20a

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合は、保証の対象とはなりません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名　IO テスト PE 標識抗体　CD20　IOB20a
成分　PE 標識マウスモノクローナル抗体 IgG 画分

【対象抗原】

CD20（分子量 35-37kD）

CD20 抗原は、末梢血、リンパ節、脾臓、扁桃、骨髄中のすべての B 細胞に発現する"pan-B"マーカーです。B 細胞の分化段階上では、CD19 より遅れて発現し、形質細胞に分化すると発現が失われます。

【クローン（アイソタイプ及び免疫原）】

B9E9（マウス IgG2a、ヒト B 細胞で免疫）

【標　識】

PE:　Phycoerythrin
励起波長 486〜575nm、蛍光波長 560〜590nm

使用目的

白血球細胞表面抗原【CD20】（CD20 抗原陽性細胞）の測定

測定原理

測定方法は、フローサイトメトリーを用いた直接免疫蛍光法です。細胞に PE（オレンジ色蛍光色素）で標識した抗体を反応させ、フローサイトメーターを用いて各抗体の陽性細胞の計測を行います。

操作上の注意

1. IO テストは、フローサイトメトリー用の抗体試薬です。
2. 抗凝固剤としてEDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれの場合も採血後は室温で保存します。
3. 長時間（おおむね採血後 6 時間以上）検体を保存する場合は、検体の安定性についてあらかじめ検討してください。
4. 溶血不良となるおそれがあるため、血液を試験管に分注する際は試験管の上部壁面に血液を付けないよう注意してください。付着した血液は、綿棒等で取り除いてください。
5. 有核赤血球、蛋白濃度が異常な場合、ヘモグロビン合成異常等では、赤血球の溶血が不完全となる場合があります。この場合、溶血していない赤血球を白血球としてカウントするために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあります。
6. 溶血時間が長すぎると白血球にも影響が及ぶことがあります。
7. Ficoll-Paque 分離液による単核細胞の比重遠心分離に伴い、白血球中の特定の細胞集団が選択的に失われることがあります。
8. フローサイトメーターの調整不良、感度やゲート等の不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
9. サンプル調製方法や試薬、フローサイトメーターの機種や測定条件などの違いにより測定値が影響を受けるおそれがあるため、正常参考値は施設ごとに設定してください。
10. 各々の白血球細胞集団の変動は必ずしも病態と一致するとは限らないため、測定結果は臨床所見及び他の検査データと共に使用してください。
11. 測定結果の解釈を行う場合には、測定条件及び供血者の年令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮してください。

用法・用量（操作方法）

1. 試薬の調製

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用できます（20μL／テスト）。

【その他必要な試薬】

(1) PBS（リン酸緩衝生理食塩水）
PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。ウシ血清アルブミン（BSA、終濃度 0.5%）やアジ化ナトリウム（終濃度 0.1%）等を添加したものも使用可能です。

(2) ホルムアルデヒド加 PBS
溶血試薬（下記）にVersaLyseを用いる場合は、PBS 1mLに対し IOTest 3 固定試薬（製品番号 A07800）12.5μL の割合で希釈します（0.1%ホルムアルデヒド加 PBS）。
VersaLyse以外の溶血試薬を用いる場合は、PBS 1mLに対し IOTest 3 固定試薬（製品番号 A07800）67.5μL の割合で希釈します（0.5%ホルムアルデヒド加 PBS）。

(3) 溶血試薬
以下のフローサイトメトリー用溶血試薬のいずれかを使用してください。
溶血試薬は添付の取扱説明書に従って調製、使用してください。
製品番号 A09777 VersaLyse 溶血試薬
製品番号 IM1400 OptiLyse B （他社フローサイトメーター用）
製品番号 A11895 OptiLyse C （ベックマン・コールター社フローサイトメーター用）
製品番号 A07799 IOTest 3 溶血試薬

(4) コントロール試薬（アイソタイプコントロール抗体）
IOTest Mouse IgG2a-PE
製品番号 A09142　容量 100 テスト（2mL）

(5) Ficoll-Paque 分離液
Phamacia カタログ番号：17-0840-03 または相当品を使用してください。

2. 全血サンプルを検体とする場合（全血法）

【検体の採取と調整】

試験管 1 本につき 100μL の血液を必要とします。

抗体の染色に最適な白血球数が 5×10^3個／mm^3であるため、白血球数が 10×10^3個／mm^3を超える場合は、PBS で検体を希釈し、3×10^3／mm^3より少ない場合には、以下の手順で白血球を濃縮します。

白血球濃縮方法（バフィーコート回収法）

(1) 検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心分離します。
(2) 白血球の層をパスツールピペットで採取します。その際に、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
(3) 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
(4) ユニセル DxH800 等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて白血球数を測定します。
(5) PBS で白血球数を 5〜10×10^3個／mm^3の範囲に調整します。

【染色操作法】

(1) 抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
(2) 各々の試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ってください。
(3) モノクローナル抗体試薬 20μL を反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、コントロール試薬（IOTest Mouse IgG2a-PE など、別売）を 20μL 加えます。
(4) よく攪拌し、室温、暗所で 15 分間反応させます。
(5) 赤血球を溶血させます。用いる溶血試薬の取扱説明書に従って、溶血処理を行ってください。
(6) 溶血が完了（サンプルの濁りが消える）したら、PBS を 2mL 加え、攪拌します。
(7) 400×g、3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
(8) (6)〜(7)の操作を繰り返します。
(9) 沈渣に適量（0.5〜1mL）の 0.1%（または 0.5%）ホルムアルデヒド加 PBS を加え、よく攪拌します。
(10) フローサイトメーターで目的の細胞の蛍光陽性率を測定します。

サンプルはアイスバス中で遮光保存し、24 時間以内に測定してください。

3. Ficoll-Paque 分離単核細胞を検体とする場合

【検体の採取と調整】

(1) 試験管に血液（抗凝固剤を含む）を 3〜4mLとり、ほぼ等量の PBS を加え、転倒混和します。
(2) 別の試験管に Ficoll-Paque 分離液を 4mL 入れ、その上に(1)の希釈血液を重層します。
(3) 2〜8℃で 400×g（分離液により異なる）、30分間遠心分離します。
(4) Ficoll-Paque 分離液と血漿の間の層（単核球層）をパスツールピペットで採取し、別の試験管に移します。
(5) PBS を加えて攪拌し、2〜8℃で 400×g、8分間遠心分離します。
(6) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく攪拌します。
(7) 2〜8℃で 400×g、4 分間遠心分離します。
(8) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく攪拌します。
(9) 2〜8℃で 400×g、3 分間遠心分離します。

(10)上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えて細胞濃度を 5×10^3 個／mm^3 (5×10^6個／mL)に調整します。
(11)トリパンブルー等で、細胞のバイアビリティ(生残率)をチェックします。バイアビリティは 90%以上が適当ですが、検体によってはこれを下回ることがあります。

【染色操作法】

(1) 抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
(2) 各々の試験管に Ficoll-Paque 調製サンプルを 5×10^5 個(細胞濃度が 5×10^6 個／mL の場合 100μL)ずつ分注します。
(3) モノクローナル抗体試薬 20μL を反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、コントロール試薬(IOTest Mouse IgG2a-PE など、別売)を 20μL 加えます。
(4) よく攪拌し、2～8℃、暗所で 30 分間反応させます。
(5) PBS 2mL を加え、2～8℃で 400×g、5 分間遠心分離し、上清を吸引除去します。
(6) ステップ(5)の操作を繰り返します。
(7) 適量(0.5～1mL)の 0.5%ホルムアルデヒド加 PBS を加え、よく攪拌します。
(8) フローサイトメーターで目的の細胞の蛍光陽性率を測定します。

サンプルはアイスバス中で遮光保存し、24 時間以内に測定してください。

測定結果の判定方法

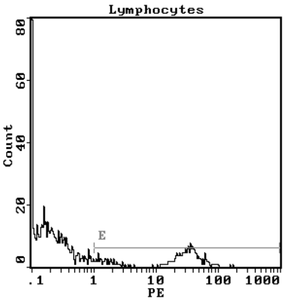
【フローサイトメーターによる測定】

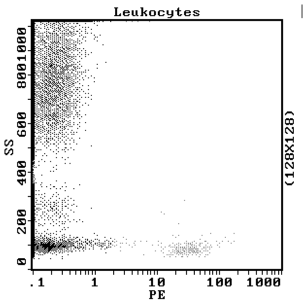
使用するフローサイトメーターは、あらかじめ光学系の設定と散乱光及び蛍光の感度調整を行ってください。詳細は機器取扱説明書をご参照ください。

前方散乱光(FS)と側方(90° 方向)散乱光(SS)によるスキャッタサイトグラム上で目的とする細胞領域にゲートを設定します。ゲート内解析細胞数を数千個以上とることで、精度の良い分析結果が得られます。

データ解析は、PE 蛍光(Log スケール)ヒストグラムで行います。蛍光陽性分画のカーソルは、コントロール試薬で同様に染色処理したサンプルを対照として設定します。通常は、コントロール試薬の陽性率が 2%以下になるようにカーソル位置を設定しますが、腫瘍検体などでは設定が困難なことがあります。コントロール試薬の陽性率が 2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがあります。

図 ヒストグラム例(健常者末梢血、全血法、EPICS XL で測定)
左:リンパ球領域、 右:全白血球(側方散乱 vs. PE 蛍光)





【測定条件の確認】

測定条件が正しいかどうかを確認するには、CYTO-TROL(精度管理用陽性コントロール細胞、製品番号 6604248)または健常者検体を陽性コントロール検体として測定します。

リンパ球サブセット分析の場合、Fc レセプタを介した単球や顆粒球に対する非特異結合は、リンパ球領域を正しくゲーティングすることで除外できます。検体ごとにリンパ球ゲート確認用抗体試薬(IOTest CD45-FITC/CD14-PE、製品番号 A07738)を測定することで、単球を含まない正しいリンパ球領域のゲーティングが可能です。

各検体のリンパ球に対する非特異的結合を確認するために、陰性対照には適切なコントロール試薬(IOTestアイソタイプコントロール抗体)を使用してください。

臨床的意義

白血球には、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、顆粒球などで構成されており、それぞれの細胞群は、機能の異なる亜群(サブセット)、あるいは異なる分化段階の細胞に細分化することができます。免疫応答はこれらのサブセットの相互作用及び直接作用により調節されており、それぞれのサブセットは特徴的な細胞表面抗原を有しています。

細胞融合法の確立によって各種のモノクローナル抗体が作製され、それらを利用して分化段階や機能の異なるサブセットを細胞表面抗原の発現様式で解析することが可能となりました。白血球の各細胞集団とそれらのサブセットの分析は、白血球の機能的分類及び分化段階の検索はもとより、疾病に関連した免疫応答の解析、免疫機能異常の診断や治療においても重要です。さらに、白血病やリンパ腫などの造血系腫瘍においては、腫瘍細胞の細胞系列や分化段階の同定(タイピング)に有用です。IO テストは、白血球の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで分析するためのモノクローナル抗体試薬です。

性能

【特異性】

本試薬を用いてヒト由来 CD20 抗原陽性培養細胞(Nalm-6 細胞(1)及び Raii 細胞(2))を検体として測定したとき、陽性率は 95%以上です。また、ヒト由来 CD20 抗原陰性培養細胞(JURKAT 細胞(3))を検体として測定したとき、陽性率は 0.5%以下です。

(1) Nlm-6 細胞:pre-B ALL 由来培養細胞株
(2) Raji 細胞:Burkitt lymphoma 由来培養細胞株
(3) JURKAT 細胞:T-cell Leukemia 由来培養細胞株

【感 度】

本試薬を PBS で 4 倍希釈し、ヒト由来 CD20 抗原陽性培養細胞(Nalm-6 細胞・Raii 細胞)及び健常人検体 3 例を測定したとき、陽性細胞の割合は本試薬をそのまま用いて測定した場合の±10%範囲内です。

【再現性】

本試薬を用いて健常人検体 3 例を 5 回以上同時に測定した場合、陽性率の変動係数は±5%以内です。

使用上または取扱上の注意

1. 本製品は、アジ化ナトリウムを 0.1%含有しています。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生するため、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物の金属性の排水管内への蓄積による爆発の危険性を避けるため、廃棄は多量の流水で希釈して行ってください。
2. 試薬を凍結保存しないでください。
3. 試薬の外観に変化が見られる場合やコントロール検体の測定値に大きな変化がある場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。
4. 使用期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
5. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示及び処理をした後に廃棄してください。
6. 皮膚や粘膜に検体や試薬が触れないように注意してください。ピペットを口で吸引しないでください。
7. 保管やインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
8. 試薬が微生物に汚染されないようご注意ください。

貯蔵方法・有効期間

貯法:2～8℃　　　有効期間:12 ヶ月
(使用期限は、ボトルに表示があります。)

包装単位

IO テスト PE 標識抗体 CD20 IOB20a

製品番号 IM1451　　　容量 100 テスト (2mL)

主要文献

1. Braylan, R C., Orfao, A., Borowitz, M J., Davis, B H., “Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting” 2001, Cytometry, 46, 23-27.
2. Jenning, C.D., Foon, K.A., "Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy", 1997, Blood, 8, 90, 2863-2892.
3. Rosenberg, S.A., "Classification of lymphoid neoplasms", 1994, Blood, 5, 84, 1359-1360.
4. Zhou, L.J., Tedder, T.F., "CD20 Workshop panel report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 511-514.

問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目 5 番 7 号 TOC 有明ウエストタワー
TEL:0120-566-730 FAX:03-5530-2460

製造販売業者の名称及び住所

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目 5 番 7 号 TOC 有明ウエストタワー